

DETECÇÃO DOS TRANSCRITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO IGF-II EM TECIDOS DE AVES

Transcript Detection of Insulin-Like Growth Factor II in Chicken Tissues

Jane Eyre Gabriel¹
Luiz Lehmann Coutinho²

Resumo

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são agentes críticos que regulam positivamente importantes vias de proliferação e diferenciação celular envolvidas no crescimento animal. O objetivo do presente estudo foi detectar transcritos do gene IGF-II durante o desenvolvimento fetal e pós-natal de galinha por análises de RT-PCR. RNA total foi extraído a partir de embriões inteiros de galinha em diferentes estádios de desenvolvimento e de tecidos hepático, muscular e adiposo de uma ave com 3 semanas de idade. Inicialmente, a primeira fita de cDNA foi obtida por ensaios de transcrição reversa a partir de amostras de RNA total na presença da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, reações em cadeia da polimerase foram realizadas a fim de amplificar seqüências correspondentes ao gene IGF-II empregando "primers" específicos e um DNA polimerase. Nossos resultados demonstraram a presença de fragmentos do fator IGF-II em todos os estádios de desenvolvimento analisados. Entretanto, sinais de amplificação desse gene não foram observados nos tecidos hepático, muscular e adiposo em nossas condições experimentais. As descobertas apresentadas no presente estudo reforçam evidências descritas em mamíferos, demonstrando que a ação do gene IGF-II é potencialmente induzida em distintas fases do desenvolvimento embrionário de aves, em contraste aos baixos efeitos exibidos sobre o crescimento pós-natal.

Palavras-chave: IGF-II; Tecidos de galinha; Ensaios de RT-PCR; Expressão gênica.

Abstract

Insulin-like growth factors (IGFs) are important positive modulators of overall body growth in different species. In this respect, the aim of the present study was to detect transcripts of IGF-II in chicken tissues during fetal and post-natal growth by RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from whole chicken embryos at different developmental stages and from muscle, hepatic and adipose tissues of a 3-weeks-old bird. Initially, cDNAs were obtained from total RNA samples using oligo(dT) primers and reverse transcriptase enzyme. Polymerase chain reactions were carried out using specific primers to amplify the gene sequence of chicken IGF-II in presence of Taq DNA polymerase enzyme. Amplified products were visualized on agarose gels stained with ethidium bromide and photographed. Under our experimental conditions, IGF-II transcripts were observed at all stages analyzed. On the other hand, PCR products of this factor were not detected in any tissues elsewhere. Such findings reinforce evidences describing an accentuated induction of IGF-II factor during avian embryogenesis, in contrast to low effects exhibited on post-natal growth. Results presented in this study provide a better understanding of the basic mechanisms associated with the gene expression of IGF system in avian embryogenesis.

Keywords: IGF-II gene; Chicken tissues; RT-PCR analysis; Gene expression.

¹ Bióloga, Doutora em Ciências pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP. Estagiária pós-doutoral bolsista DTI/CNPq. Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária. Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR. Rodovia BR 376, km 14. CEP: 83010-500. São José dos Pinhais, PR. E-mail: jegabrie@netsite.com.br, labgenoma@pucpr.br

² Eng. Agrônomo, Professor Livre Docente Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ/USP. Laboratório de Biotecnologia Animal. Departamento de Produção Animal. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

Introdução

O crescimento em um animal é marcado por mecanismos precisos de ativação gênica e de sinalização celular, garantindo, assim, a formação de tecidos funcionais ao longo da vida. Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são reguladores importantes de diferentes eventos biológicos desencadeados durante o desenvolvimento fetal e pós-natal, devido à sua ação autócrina/parácrina e endócrina (MCMURTRY et al., 1997). Já está bem esclarecido que as funções fisiológicas do fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) compreendem o controle sobre o sistema imunológico, participação na formação de tecido muscular esquelético e regulação do crescimento de tecido ósseo, entre outras (DENLEY et al., 2005; LELBACH et al., 2005). Embora as ações do IGF-II sejam extensamente investigadas por análises *in vitro* (DENLEY et al., 2005; FLORINI et al., 1996; LELBACH et al., 2005), poucos relatos na literatura descrevem suas funções *in vivo*, particularmente durante as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário. Assim, muitas questões ainda precisam ser respondidas, principalmente no que diz respeito às vias de sinalização celular ativadas pelos IGFs e sua intrínseca participação nos eventos envolvidos no crescimento em aves. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo detectar os transcritos do fator de crescimento IGF-II em tecidos de galinha durante o desenvolvimento fetal e pós-natal por análises de RT-PCR.

Material e métodos

1. Colheita dos embriões e extração de RNA total

Ovos férteis de galinha da linhagem Cobb500[®] foram mantidos a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em uma incubadora (ZAGAS, modelo 1201) com umidade controlada. O período de incubação dos embriões variou de 24 a 96 horas, com colheita a cada 24 horas. Três embriões foram colhidos ao final de cada tempo de incubação, sendo imediatamente estagiados de acordo com o número de somitos formados, seguindo orientações descritas por Hamburger; Hamilton (1951). Os estádios de desenvolvimento analisados compreenderam os estádios 8, 12, 20 e 23 (HH₈, HH₁₂, HH₂₀ e HH₂₃, respectivamente). Como os fatores de crescimento IGFs são

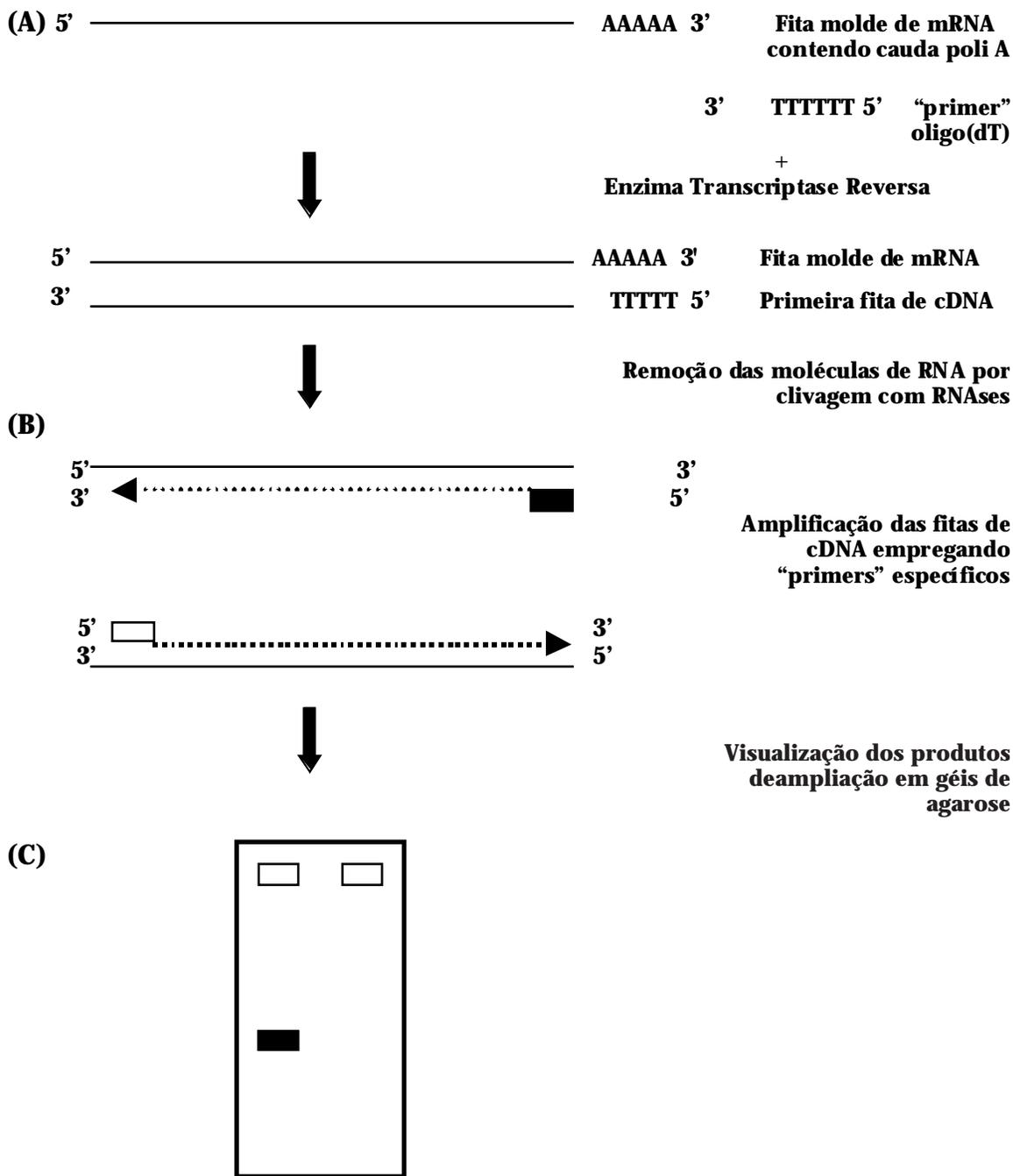
potentes agentes mitogênicos, a escolha desses estádios deveu-se ao fato que a acentuada proliferação e diferenciação celular estão ocorrendo em intenso processo em tais períodos. Em adição, 100 mg de tecidos hepático, muscular e adiposo de uma ave com 21 dias de idade também foram removidos para posterior análise. Tal estratégia foi adotada a fim de verificar sinais de amplificação dos genes de interesse em tecidos de galinha durante o crescimento pós-natal. Após a colheita, embriões e tecidos foram rapidamente dissolvidos em 1 ml de reagente Trizol (Invitrogen) para proceder a extração de RNA total, conforme metodologia proposta por Chomczynski; Sacchi (1987).

2. Ensaios de transcrição reversa e reações em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Os principais passos envolvidos na execução da técnica de RT-PCR são apresentados resumidamente na Figura 1. A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase ou RT-PCR (do inglês "Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction") compreende a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de uma fita molde de RNA mensageiro (mRNA) pela enzima transcriptase reversa. Essa reação requer a presença de oligonucleotídeos sintéticos, denominados "iniciadores" ou "primers". Os "primers" oligo(dT), comumente empregados nos experimentos de RT-PCR, são formados por 12-18 resíduos de deoxitimidina. Tal peculiaridade permite o uso desses "primers" nas análises de expressão de vários genes a partir de uma única preparação de cDNA, já que eles são capazes de flanquear a cauda poli-A⁺ presente na extremidade 3' dos mRNAs, produzindo uma população de cDNAs que corresponde à população de mRNAs presentes em um tecido ou célula (ALVARES, 2001). O cDNA sintetizado é, então, amplificado exponencialmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e pode ser detectado em géis de eletroforese (ALVARES, 2001). A PCR envolve a replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma enzima DNA polimerase, empregando "primers" complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar, capazes de delimitar o ponto de início da síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada "primer" (REGITANO, 2001).

FIGURA 1 - Principais etapas envolvidas na execução da técnica de RT-PCR. (A) síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) na presença da enzima transcriptase reversa e “primers” oligo (dT), (B) remoção da fita molde de mRNA por clivagem com RNAses e reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando “primers” específicos, (C) visualização dos produtos de amplificação em géis de eletroforese e fotodocumentação dos resultados.

Figure 1 - Main steps involved in RT-PCR assays. (A) synthesis of first strand of complementary DNA (cDNA) in presence of reverse transcriptase enzyme and oligo(dT) primers, (B) digestion of RNA template by cleavage with RNAses and polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, (C) detection of amplified products on agarose gels and documentation of results.



Inicialmente, 1 µg de RNA total foi empregado nas reações de transcrição reversa (RT) para a obtenção da primeira fita de cDNA na presença da enzima transcriptase reversa (Figura 1A). Após desnaturação a 70°C por 10 minutos, as amostras de RNA foram incubadas em tampão de PCR 1X concentrado (10 mM Tris-HCl, pH 9,5, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM mistura de dNTPs, 500 ng de "primer" oligo(dT) e 200 unidades da enzima SuperScriptII (Invitrogen) em um volume final de 20 µl. Esta reação foi mantida a 42°C por 50 minutos e subsequentemente foi incubada com 1 unidade de RNase H por 20 minutos a 37°C para digestão da fita molde de RNA (Figura 1A).

Como observado na Figura 1B, reações de amplificação foram posteriormente conduzidas utilizando "primers" direto e reverso desenhados por programas apropriados (OLIGO Primer Analysis Software, versão 6.71 para Windows) a partir das seqüências nucleotídicas previamente descritas para os genes de interesse (DARLING; BRICKELL, 1996; KOST et al., 1983). Tais "primers" flanqueiam regiões localizadas entre pelo menos um íntron a fim de permitir a visualização de possíveis amplificações indesejadas a partir de contaminações com DNA genômico. As reações de amplificação específicas para o gene IGF-II foram realizadas a partir de 10% (2µl) do volume total das reações de RT, 0,5 mM de "primers" específicos (direto: 5' TGCCAAGTCCGTCAAGTCAGAGCG 3', reverso: 5' CCGGCTGGTCACAGTTCATTCC 3') e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão de PCR 1X concentrado contendo 10 mM Tris-HCl, 1,5-2,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl. Em nossas condições experimentais, reações de amplificação também foram executadas a fim de verificar os níveis do gene β-actina, estabelecendo assim um importante controle positivo para a normalização das PCRs. Tais reações foram estabelecidas nas mesmas condições descritas acima, empregando os "primers" direto 5' AATGAGAGGTTCAAGTGCCC 3' e reverso 5' ATCACAGGGG-TGTGGGTGTT 3'. Estas reações foram mantidas em termociclador (MJ Research, PT-200) e submetidas à desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido por anelamento por 40 segundos e extensão correspondente a 72°C por 40 segundos. As temperaturas de anelamento para os genes IGF-II e β-actina foram 57°C e 56°C, respectivamente, em um total de 35 ciclos. Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose, corados em solução de brometo de etídeo e, imediatamente, fotografados com câmara digital (Kodak EDAS 290) (Figura 1C).

Resultados e discussão

Como observado na Figura 2, a presença de transcritos do gene IGF-II foi investigada em tecidos de galinha durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal por análises de RT-PCR.

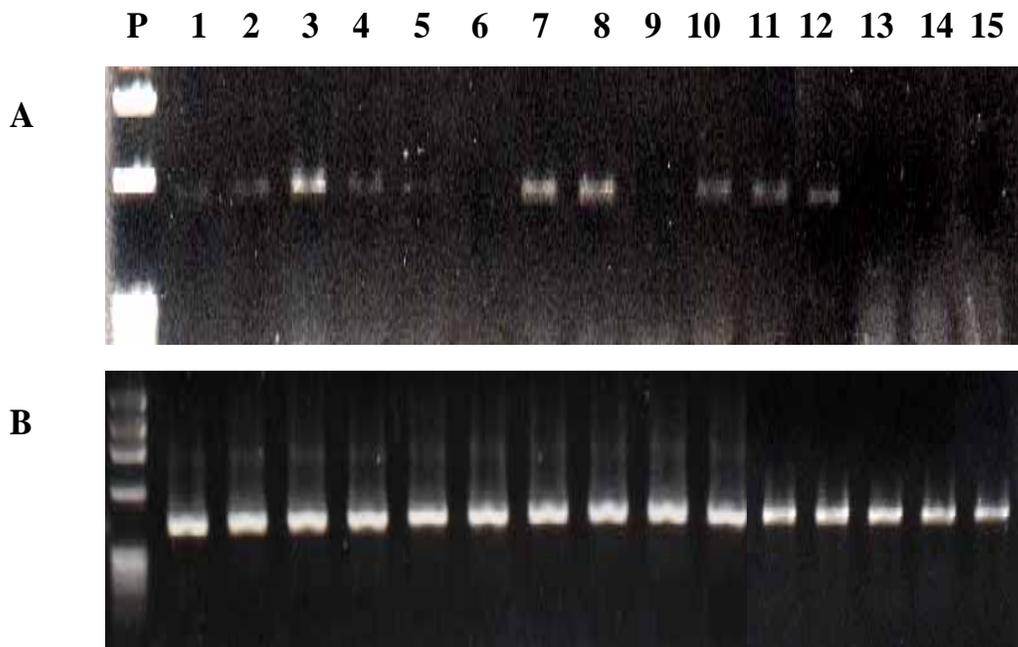
Produtos de amplificação de 600 pb correspondentes ao gene IGF-II foram observados já nos primeiros estádios de desenvolvimento, sendo constatado níveis similares na intensidade do sinal amplificado independente do estágio de desenvolvimento analisado (Figura 2A, canaletas 3, 7 e 8). Entretanto, não foi possível verificar a presença dos transcritos do gene IGF-II em nenhum dos tecidos analisados (Figura 2A, canaletas 13 a 15).

Já está bem esclarecido que o IGF-II é um dos principais fatores de crescimento expressos durante o desenvolvimento fetal, sendo detectado *in vitro* nos mais variados tipos de tecidos de embriões de galinha em diferentes estádios de desenvolvimento (DENLEY et al., 2005; LELBACH et al., 2005). É preciso ressaltar que após a ovoposição, o blastodisco, estrutura embrionária que mobiliza toda a informação necessária para o desenvolvimento e a formação do embrião, possui milhares de células em intenso processo de divisão celular (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Dessa forma, a presença de sinais de amplificação do gene IGF-II em embriões de galinha logo nos estádios precoces de desenvolvimento corrobora estudos demonstrando que esse gene desempenha uma função essencial na ativação dos processos de proliferação e determinação celular nas etapas iniciais da embriogênese (FLORINI et al., 1996; MCMURTRY et al., 1997). Nossas descobertas confirmam evidências que a expressão dos IGFs ocorre em distintas fases do crescimento animal, sendo observado marcante atuação do fator IGF-II durante o desenvolvimento fetal, em contraste aos baixos efeitos exibidos sobre o crescimento pós-natal.

Tendo em vista que inúmeros genes apresentam expressão espacial e temporal precisa durante a embriogênese de vertebrados, análises de expressão gênica têm sido sensivelmente favorecidas com o advento de técnicas de biologia molecular cada vez mais sensíveis. Na última década, ensaios de RT-PCR vêm sendo conduzidos com grande êxito para detectar moléculas de mRNAs raras em uma grande variedade de tecidos embrionários. A amplificação dos cDNAs a partir de amostras de embriões inteiros e de tecidos usando

FIGURA 2 - Detecção dos transcritos do fator de crescimento semelhante à insulina II em tecidos de galinha. Produtos de amplificação dos genes IGF-II (A) e β -actina (B). Canaletas: 1 a 3 - embriões no estágio HH8; 4 a 6 - embriões no estágio HH12; 7 a 9 - embriões no estágio HH20; 10 a 12 - embriões no estágio HH23; 13 a 15 - tecidos hepático, adiposo e muscular de uma ave com 3 semanas de idade, respectivamente. P: padrão de peso molecular de fragmentos de DNA (Invitrogen).

Figure 2 - Transcript detection of "insulin-like" growth factor II in chicken tissues. PCR products of IGF-II (A) and β -actin (B) genes. Lanes: 1 to 3 - embryos at stage HH8; 4 to 6 - embryos at stage HH12; 7 to 9 - embryos at stage HH20; 10 to 12 - embryos at stage HH23; 13 to 15: hepatic, muscle and fat tissues of a 3-weeks-old bird, respectively. P: DNA size ladder (Invitrogen).



“primers” específicos ao gene da β -actina ocorreu eficientemente, gerando um produto de amplificação de aproximadamente 400 pb, como pode ser observado na Figura 2B. Tais resultados descartam a possibilidade que a não detecção dos transcritos de IGF-II nos tecidos da ave jovem seja resultado de falhas durante a otimização dos ensaios de RT-PCR ou devido à baixa sensibilidade dessa metodologia. Dessa forma, a amplificação do fragmento de β -actina parece fornecer fortes indícios de que a ausência de sinais de amplificação do fator IGF-II nos tecidos da ave adulta poderia estar refletindo diretamente os baixos efeitos de sua ação biológica sobre o crescimento pós-natal de aves.

Como pode ser observado na Figura 2A (canaletas 6 e 9), sinais de amplificação do gene IGF-II não foram detectados em dois embriões analisados. Tal ocorrência poderia estar associada

ao fato de que alguns estudos demonstram diferenças significativas na abundância de mRNA dos fatores de crescimento semelhantes à insulina entre machos e fêmeas. Bacon et al. (1993), investigando os níveis plasmáticos de IGF-I circulante em perus de diferentes sexos geneticamente selecionados para alta e média taxa de ganho de peso corporal, observaram que esta proteína está positivamente correlacionada a taxas de crescimento no período neonatal (1-7 semanas de idade), mas não relacionada ao crescimento em machos e negativamente correlacionada ao crescimento de fêmeas de 8 a 28 semanas de idade (BACON et al., 1993). Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos a fim de testar uma possível correlação entre variações no padrão de expressão do gene IGF-II em embriões de aves de diferentes sexos.

Conclusões

Inúmeros trabalhos têm investigado o papel crucial dos fatores de crescimento semelhantes à insulina IGFs durante o desenvolvimento embrionário animal. Os resultados descritos nesse estudo reforçam descobertas conduzidas em mamíferos, demonstrando que o fator de crescimento IGF-II apresenta acentuada indução preferencialmente durante a embriogênese de aves, exibindo baixos efeitos sob a diferenciação e morfogênese animal na fase adulta.

A capacidade de crescimento de um animal depende em grande parte do número de fibras musculares originadas durante o desenvolvimento embrionário. Em aves e mamíferos, esse número permanece praticamente inalterado após o nascimento (REHFELDT et al., 2000). Assim, nos organismos adultos, apenas o aumento do diâmetro das fibras musculares pode resultar em ganhos significativos na deposição de massa muscular em espécies domésticas. Dessa forma, eventos moleculares desencadeados durante o desenvolvimento embrionário são mecanismos-chave para o crescimento de um animal na fase adulta. Diferenças no padrão de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário podem vir a se tornar uma valiosa ferramenta para os programas de melhoramento genético, reduzindo o tempo e os custos necessários para a obtenção de características desejadas. Nesse contexto, podemos especular que as descobertas apresentadas no presente estudo fornecem informações relevantes sobre o padrão de detecção dos transcritos do fator de crescimento IGF-II durante a embriogênese, o que poderá abrir novas possibilidades para seu potencial emprego em futuros programas de melhoramento genético de aves.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP, a qual contribuiu efetivamente para a execução do presente estudo.

Referências

ALVARES, L. E. Aplicação da RT-PCR nos estudos de expressão gênica. In: ALVARES, L. E.; REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Eds.). **Biologia molecular aplicada à produção animal**. 2001. p. 135-150.

BACON, W. L.; NESTOR, K. E.; EMMERSON, D. A.; VASILATOS-YOUNKEN, R., LONG, D. W. Circulating

IGF-I in plasma of growing male and female turkeys of medium and heavy weight lines. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, p. 267-277, 1993.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

DARLING, D. C.; BRICKELL, P. M. Nucleotide sequence and genomic structure of the chicken insulin-like growth factor-II (IGF-II) coding region. **General Comparative Endocrinology**, v. 102, p. 283-287, 1996.

DENLEY, A.; COSGROVE, L.; BOOKER, G.; WALLACE, J.; FORBES, B. Molecular interactions of the IGF system. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 421-439, 2005.

FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z.; COOLIGAN, S. A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 5, p. 481-517, 1996.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

KOST, T. A.; THEODORAKIS, N.; HUGHES, S. H. The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 8287-8301, 1983.

LELBACH, A.; MUZES, G.; FEHER, J. The insulin-like growth factor system: IGFs, IGF-binding proteins and IGFBP-proteases. **Acta Physiology of Hung**, v. 92, p. 97-107, 2005.

McMURTRY, J. P.; FRANCIS, G. L.; UPTON, Z. Insulin-like growth factors in poultry. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 4, p. 199-229, 1997.

REGITANO, L. C. A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Eds.). **Biologia molecular aplicada à produção animal**. 2001. p. 25-39.

REHFELDT, F. S.; NIKOVITS JUNIOR, W.; CHRIST, B. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, v. 66, p. 177-188, 2000.

Recebido em: 24/03/2005

Aprovado em: 30/06/2005